

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-072178

(43)Date of publication of application : 23.03.1993

(51)Int.Cl.

G01N 27/447

(21)Application number : 03-233489

(71)Applicant : HITACHI LTD

(22)Date of filing : 12.09.1991

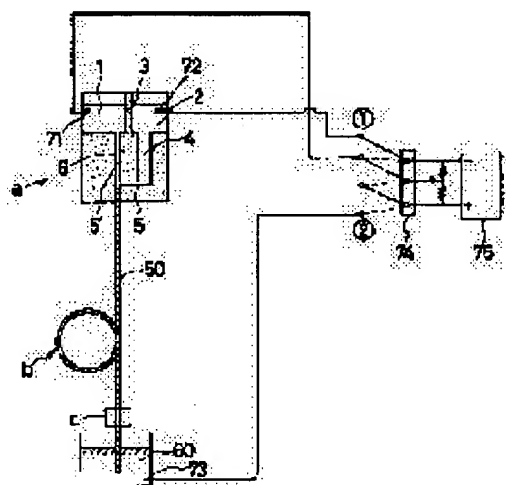
(72)Inventor : KANBARA HIDEKI

(54) ELECTROPHORETIC DEVICE

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide an electrophoretic device capable of analyzing only by using extremely small quantity of sample same as a quantity actually necessary for analytical detection, in an electrophoretic device for DNA and the like.

CONSTITUTION: A sample pouring part (a) is provided with two buffer tanks 1,2, and the second buffer-tank 2 is connected to the first buffer-tank 1 through a sample pouring well 4 and a thin tube 5. A molecular sieving membrane 6 is provided on the way of the thin tube. A part of the thin tube between the sample pouring well 4 and the molecular sieving membrane 6 is connected to the inlet of a capillary through a thin tube. Sample poured in the wide sample pouring well is processed by electrophoresis in narrow territory of the thin tube 5, and after the sample is concentrated and held, electrophoretically separated, therefor, the major part of prepared sample can be effectively used in analysis, and even in the case of sample of low concentration, it can be sensitively separated and detected.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

27.07.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3075602

[Date of registration] 09.06.2000

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-72178

(43)公開日 平成5年(1993)3月23日

(51)Int.Cl.⁵

G 0 1 N 27/447

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

7235-2J

G 0 1 N 27/ 26

3 1 5 D

7235-2J

3 3 1 Z

審査請求 未請求 請求項の数6(全 6 頁)

(21)出願番号

特願平3-233489

(22)出願日

平成3年(1991)9月12日

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 神原 秀記

東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔

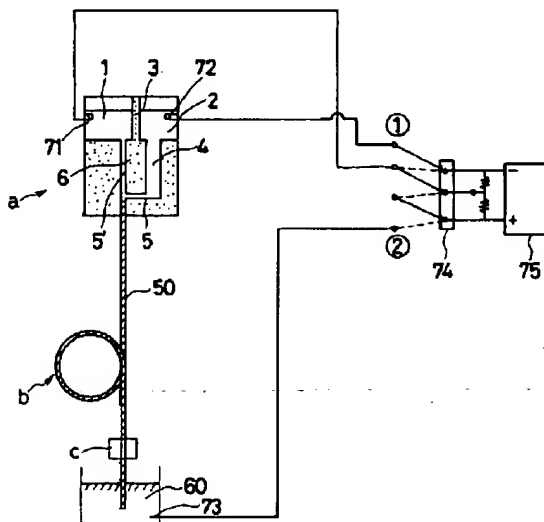
(54)【発明の名称】 電気泳動装置

(57)【要約】

【目的】 DNA等の電気泳動装置において、分析検出に実際に必要な試料と同量の極微量の試料を用いるのみで分析することが可能な電気泳動装置を得る。

【構成】 試料注入部aは二つのバッファー槽1、2を有し、第2のバッファー槽は試料注入ウェル4と細管5を介して第1のバッファー槽1と連結している。細管の途中に分子ふるい膜6が設けられる。試料注入ウェル4と分子ふるい膜6の間の細管の一部でキャピラリーの入り口に細管で連結される。

【効果】 広い試料注入ウェルに注入した試料を細管5の狭い領域に電気泳動し、試料を濃縮して保持した後、電気泳動分離するので作成した試料の大部分を有効に分析に使用でき、濃度の低い試料でも感度良く、分離、検出することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料注入部、分離泳動部、検出部、及び泳動用高圧電源供給部とからなる蛍光検出型電気泳動装置において、該試料注入部は相互に細管部分で連結された二つのバッファ槽及び該細管部分に位置する検出対象物は通過し得ないが検出対象物より小さいサイズの物質は通過し得る第1の分子ふるい膜とを有していると共に、該分離泳動部は該分子ふるい膜の近傍上流側に開口しており、かつ泳動用高圧電源供給部は該二つのバッファ槽間及び二つのバッファ槽間の一方と分離泳動部間とに切り替え自在に接続していることを特徴とする電気泳動装置。

【請求項2】 該細管部分のより上流側には検出対象物は通過し得るが検出対象物より大きいサイズの物質の通過は阻止する第2の分子ふるい膜が設けられており、該分離泳動部は、第2と第1の分子ふるい膜間の該細管部分に開口していることを特徴とする、請求項1記載の装置。

【請求項3】 分離泳動部がバッファ液を満たした中空キャビラリーであることを特徴とする、請求項1または2記載の装置。

【請求項4】 分離泳動部がガラスキャビラリー内部に形成されたゲルであることを特徴とする、請求項1ないし3いずれか記載の装置。

【請求項5】 分離泳動部が2枚のガラス平板の間に形成された平板型ゲルであることを特徴とする、請求項1または2記載の装置。

【請求項6】 分子ふるい膜面積を該分離泳動部の断面積とほぼ等しいかあるいはより小さな面積に制限する手段を具備することを特徴とする、請求項1ないし5いずれか記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は電気泳動装置、特に、試料導入部が改良されたDNA等の分離検出に有効なゲル電気泳動装置に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、DNAシーケンシングをはじめ、DNAの分離検出には平板型ゲル（スラブゲル）が用いられてきた。この装置でのDNAの最小検出量は測定領域内のDNA濃度と体積に依存する。従って、微量の試料を有効に検出するためにはDNAバンドの体積を小さくする必要がある。これを実現する方法としてキャビラリー電気泳動法が提案されておりDNA解析にも使用されている（Anal. Chem. 62, 900-903, (1990)）。

【0003】キャビラリー電気泳動に現在用いられている装置は図5にその概念図が示されるように、バッファ液で満たされた第1と第2のバッファ槽101、102とを有し、二つのバッファ槽内には泳動電界電位を与えるため高電圧電源Bからの電極103、104が装着さ

れている。また、二つの槽内のバッファ液はキャビラリー105を介して連通し得るようにされており、該キャビラリーの適宜箇所に検出部106が位置している。この装置を用いてDNA等の分離検出を行うに当たっては、バッファ液で満たされたバッファ槽からキャビラリーの先端を離脱させ、外部に位置する試料溜Sにその先端を挿入して所定量の試料をキャビラリーの先端に導入した後、再びキャビラリーの先端をバッファ槽内のバッファ液内に浸漬させる。しかる後、バッファ槽間に泳動電極を与え試料を電気泳動させ分析を行う。

【0004】この種のキャビラリー電気泳動においては、通常試料は μ lのオーダーの試料溜から、電界注入によりnl程度がキャビラリー内に入り分析される。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】上記従来技術ではキャビラリーに注入される試料量はわずかであるが、注入量の100倍近い試料を試料溜に必要とする難点があった。このため、分離検出に必要な実際の試料の必要最小量は必ずしも小さくなく、極微量成分の分析には難点があった。

【0006】本発明の目的は、試料溜中にあるDNA等の分析対象試料のほぼ全量をいったん濃縮し、その後分離泳動部に泳動させることにより、分析検出に実際に必要な極微量の試料とほぼ同量の試料を試料溜に提供するだけで、十分な分離検出を行い得る電気泳動によるDNA等の試料分離分析装置を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明は、試料注入部、分離泳動部、検出部、及び泳動用高圧電源供給部とからなる蛍光検出型電気泳動装置において、該試料注入部は相互に細管部分で連結された二つのバッファ槽及び該細管部分に位置する検出対象物は通過し得ないが検出対象物より小さいサイズの物質は通過し得る第1の分子ふるい膜とを有していると共に、該分離泳動部は該分子ふるい膜の近傍上流側に開口しており、かつ泳動用高圧電源供給部は該二つのバッファ槽間及び二つのバッファ槽間の一方と分離泳動部間とに切り替え自在に接続していることを特徴とする電気泳動装置を開示する。

【0008】該細管部分のより上流側に検出対象物は通過し得るが検出対象物より大きいサイズの物質の通過は阻止する第2の分子ふるい膜が設け、該分離泳動部を第2と第1の分子ふるい膜間の該細管部分に開口させることにより、より目的を達成することができる。分離泳動部はバッファ液を満たした中空キャビラリーであってよく、またガラスキャビラリー内部に形成されたゲルであってもよい。さらに、2枚のガラス平板の間に形成された平板型ゲルであってもよい。

【0009】また、分子ふるい膜面積を該分離泳動部の断面積とほぼ等しいかあるいはより小さな面積に制限す

3

る手段を具備することにより、より目的は達成される。

【0010】

【作用】本発明による電気泳動装置の好ましい態様においては、試料注入部は、第1及び第2のバッファ槽と、第2のバッファ槽内の底部に位置する試料注入ウェルと、分子サイズを選択分離する分子ふるい膜と、二つのバッファ槽相互間を連結する細管によって構成されている。また、上記分子ふるい膜は好ましくは第1のバッファ槽と第2のバッファ槽とを連結する細管の途中に設けられる。試料の分析にあたり、まず試料を上記第2のバッファ槽内の底部に設けた試料注入ウェルに注入し、上記第1及び第2のバッファ槽をバッファ液で満たす。それにより上記細管内はバッファ液で満たされるとともに、該分子ふるい膜近傍にその入り口を開口している分離泳動部もバッファ液で満たされる。

【0011】この状態で上記泳動用の電極間に電位を与えて、第1及び第2のバッファ槽間での電気泳動を可能とする。分子ふるい膜はバッファ液中の分子サイズの小さい塩は通すが、分子サイズの大きなDNA分子は通さないものが選択され、従って、第1及び第2のバッファ槽間での電気泳動によって、上記分子ふるい膜の面あるいはその近傍に試料は濃縮される。

【0012】このようにして濃縮されたDNA等の試料は分離泳動部のキャピラリー等に直結した領域に保持された後、分離泳動部のキャピラリー等内を電気泳動するので、ほぼ全試料を無駄なく分離、検出の測定に使用することができ、計測に必要な最小量を少なくできる。なお、本発明において「細管部分」というときは、単に細管そのもののみならず、以下の実施例、特に第2、3、4の実施例に示すように二つのバッファ槽間を連通する管路部分のすべてをいうものとする。

【0013】

【実施例】以下、本発明による電気泳動装置を添付の図面を参照したいくつかの実施例に基づきより詳細に説明する。図1は、第一の実施例を示しており、その装置をDNA断片の解析を行う場合を例にとって説明する。図において、aは試料注入部であり、第1のバッファ槽1及び第2のバッファ槽2とが隔壁3を介して位置しており、一方のバッファ槽、図においてはバッファ槽2の底部には試料注入ウェル4が設けられている。試料注入ウェル4の底部と他方のバッファ槽、図においてはバッファ槽1の底部とは細管5により連通されていて、該細管5のバッファ槽1の底部近傍には分子ふるい膜6が介装されている。この分子ふるい膜6は分子サイズの小さい塩は通すが、分子サイズの大きなDNA分子は通さない物性を有するものであって、例えば、セルロースアセテート膜やポリエーテルスルホン膜などが利用できる。

【0014】試料注入ウェル4の底部と分子ふるい膜6との間の細管5の部分には、従来公知の分離泳動部bの

4

キャピラリー50の先端が接続しており、該キャピラリー50の他方端は、第3のバッファ槽60内に解放している。さらに、キャピラリー50の下方端近傍には蛍光標識されたDNA断片等の被検出試料を検出する公知の検出手段cが設けられている。

【0015】第1、第2、第3のバッファ槽1、2、60には、それぞれ電極71、72、73が設けられており、各電極は電源切換スイッチ74を介して泳動用高圧電源75に対し以下に記す2つの態様に選択的に切り変わるように接続されている。すなわち、図1において実線で示される第2のバッファ槽2に設けた泳動電極72と第1のバッファ槽1に設けた泳動電極71との間に電位を与える第1の切り換え態様と、点線で示される第1のバッファ槽1に設けた泳動電極71と第3のバッファ槽60に設けた泳動電極73との間に電位を与える第2の切り換え態様である。

【0016】次に、この電気泳動装置を用いてDNA断片の解析を行う方法を説明する。まず、すべてのバッファ槽をバッファ液で満たす。しかる後、測定しようとする蛍光標識されたDNA断片を含む試料をマイクロシリンジ等で1〜2 μ l採取し、第2バッファ槽2の底部にある試料注入ウェル4に注入する。試料注入ウェル4は第1バッファ槽1とキャピラリーの内径と同程度の径の細管5で連結され、この細管5の途中すなわち好ましくは第1バッファ槽1の底部近傍には、細管5をふさぐように分子ふるい膜6が設けられ、かつ、試料注入ウェル4の底部と分子ふるい膜6との間の細管5の部分には、分離泳動部bのキャピラリー50の先端が接続している。従って、電源切換スイッチ74を図1の実線で示す側にして第2のバッファ槽2に設けた泳動電極72と第1のバッファ槽2に設けた泳動電極71との間に電位を与えると、蛍光標識されたDNA断片は第2のバッファ槽3下方の試料注入ウェル4から分子ふるい膜6の方向に向かって泳動する。

【0017】バッファ液中の塩など分子サイズの小さな分子は分子ふるい膜6を自由に通過するが、蛍光標識されたDNA断片分子は分子サイズが大きいため分子ふるい膜6の下部面あるいはその近傍の細管領域5'に濃縮して集積し保持される。2〜5分間泳動させることにより、ほぼすべての蛍光標識されたDNA断片分子を第2のバッファ槽2から試料保持領域である前記の細管領域5'へ濃縮して移すことができる。なお、この実施例においては、分子ふるい膜6の下部の細管領域5'の断面積は、泳動路断面すなわちキャピラリー11の断面積とほぼ同等となるようにしてあり、内径は0.1mm〜0.05mmが好適である。

【0018】次いで、電源切換スイッチ74を図1に点線で示す方へ倒し、第1のバッファ槽1に設けた泳動電極71と第3のバッファ槽60に設けた泳動電極73との間に電位を与える。それにより、細管領域

5

5'に濃縮された状態で保持されている蛍光標識DNA断片は一斉に第3のバッファ槽60の方向へ泳動を開始する。それにより蛍光標識されたDNA断片はゲルキャピラリー50内で分子サイズに応じて分離され、検出部cで検出される。

【0019】上記の説明から明らかなように、この電気泳動装置においては、試料注入ウェルに注入された試料がいったん濃縮された後、泳動分離部のキャピラリー内に導入されるので、試料注入ウェル内の全試料を無駄なく分離、検出の測定に使用することができ、計測に必要な試料の量を極微量のものとすることができる。図2は本発明による第2の実施例の試料注入部a₂の断面を示している。

【0020】この実施例の試料注入部a₂は、第2のバッファ槽22の底部に設けた試料注入ウェルの底部に第2の分子ふるい膜26'を設けている点で第1の実施例のものと基本的に異なっている。この実施例において、第1及び第2のバッファ槽21、22の底部には凹陥部が形成されており、該凹陥部の底部が細管25により相互に連通されている。

【0021】第1のバッファ槽21の底部に形成された凹陥部には細管25の開口部を覆う状態で第1の実施例のものと同様の分子ふるい膜26が装着され、該分子ふるい膜26は貫通孔27付き押さえ板28により固定されている。また、第2のバッファ槽22の底部に形成された凹陥部にも同様に細管25の開口部を覆う状態で第2の分子ふるい膜26'が装着され、該分子ふるい膜26'は試料注入ウェル24を兼ねた押さえ板24'により固定されている。第2の分子ふるい膜26'は、シーケンス解析に用いるDNA断片は透過し得るがそれより大きな分子サイズのものは透過しないメッシュをもつ膜体が選択される。

【0022】この実施例においても、特に図示しないが、第3のバッファ槽、電源切換スイッチ等電気泳動による分析に必要な他の部材は第1の実施例のものと同様に設けられる。この実施例を用いてのDNA断片の解析も、第1の実施例の場合と同様に行われる。すなわち、試料及びバッファ液をそれぞれ注入し、図1の実線で示す側に切換スイッチ74を倒し泳動を開始する。この実施例においては、試料注入ウェル24と細管25との間に上記のようなメッシュを持つ第2の分子ふるい膜26'が設けられていることにより、DNA相補鎖合成反応を用いたDNAシーケンス用断片生成に用いるM13ファージやプラスミドベクターなどのより大きなサイズの鋳型DNAは第2の分子ふるい膜26'を透過せず、それよりも小さいサイズのもののみが透過する。従って、鋳型DNAと生成したDNA断片であるシーケンス解析に用いる小さなDNA断片は第2の分子ふるい膜26'により分離される。

【0023】すなわち、鋳型DNAと生成したDNA断

6

片を含む溶液を試料注入ウェル24に注入し、第2のバッファ槽22に設けた泳動電極72と第1のバッファ槽21に設けた泳動電極71との間に電位を与えることにより、分子サイズの小さい生成したDNA断片はバッファ液中の塩などといっしょに第2の分子ふるい膜26'を通過し、第1の分子ふるい膜26の方向に泳動する。前記したように第2の分子ふるい膜26'は分子サイズの大きな鋳型DNAを通さないように選定され、第1の分子ふるい膜26は第1の実施例と同様にDNA断片を通さないものが選定されているので、DNA断片は第1の分子ふるい膜26の下面面あるいはその近傍の試料保持領域である細管領域25'に濃縮して集積する。これにより試料保持領域に濃縮して集積するDNAの総量中に占めるシーケンス用DNA断片の比率を第1の実施例のものと比較し、さらに上げることができる。以下の動作方法は第1の実施例と同じである。

【0024】本発明はキャピラリー型電気泳動装置ばかりでなく分離泳動部に平板型ゲル(スラブゲル)を用いた電気泳動装置にも適用できる。図3は本発明による第3の実施例を示すスラブゲル用の試料注入部a₃を表す斜視図をその断面と共に示している。分離泳動部を構成するゲル保持板55、55間に挟まれたスラブゲル51の上部にバックング材52を介して試料注入部a₃が取り付けられている。この試料注入部a₃は、上記の実施例と同様に二つのバッファ槽31、32とそれぞれの二つの分子ふるい膜36、36'を有しているが、それらはゲル保持板55のほぼ全長にわたって設けられており、かつ第2のバッファ槽32の底部にある試料注入ウェル44は、試料注入ウェル板48内にゲル保持板55間に設けられる泳動路の数だけ存在し、かつ、二つのバッファ槽の底部を連通する細管35も同様に泳動路の数だけ存在している。従って、泳動路の数に応じて試料保持領域である細管領域35'も存在することとなる。また、この実施例においては泳動路の形状に応じて、該細管領域35'の泳動路と直交する面での断面形状を短冊型とすることもできる。

【0025】スラブゲル形式の泳動装置においては、泳動路の断面積(あるいは幅)は試料の保持される部分の幅と泳動中に拡散で広がる幅で決定される。従って、試料の拡散による広がりを防止するために、泳動路の中に高分子リボンあるいはワイヤーを設置し、隣接する泳動路を独立させるようにしてもよい。試料の濃縮の方法、その他の動作方法は第1、第2の実施例と同じであるので、説明は省略する。図3では泳動電極は記載していない。

【0026】図4は本発明による第4の実施例を示す試料注入部a₄を表す断面図である。この実施例のものは、第1と第2の二つのバッファ槽を上下方向に一方が他方の内部に入り込む形で設置した点で上記の他の実施例のものと異なっている。すなわち、外側のバッファ

槽42内にもう一つのバッファ槽41が設けられており、それぞれ第1から第3の実施例における第2のバッファ槽及び第1のバッファ槽に対応した機能を果たすように構成されている。バッファ槽41の底部には他の実施例と同様に分離泳動部bのキャピラリー41の先端が接続しており、該キャピラリー41は外側のバッファ槽42の底部を貫通して、図示しない第3のバッファ槽に達している。バッファ槽41の底部には同様に分子ふるい膜46が設けられ貫通孔付き押さえ板48により固定されている。

【0027】この実施例においては、キャピラリー41には外側のバッファ槽42内に位置している個所において細孔が設けられるかあるいは切開した細隙45が形成される。その細孔あるいは細隙45を介して、バッファ槽42内の空間とキャピラリーの空間とが連通している。また、特に図示しないが、各泳動電極が上記の他の実施例と同様に各バッファ槽に装着されている。

【0028】使用に際し、外側の第2のバッファ槽42に試料を注入する。この試料が注入されるバッファ槽42の底部が試料注入ウェルに相当する。各バッファ槽にバッファ液を満たした後他の実施例と同様にして泳動を行う。この実施例にあってもキャピラリーに設けられた細孔あるいはキャピラリーの切開した細隙部45から電気泳動によりDNA断片が進入し、分子ふるい膜46の直下である試料保持領域45'に試料が濃縮されて導かれることが容易に理解されよう。その後の動作方法は第1の実施例と同じである。

【0029】この実施例において、キャピラリーに設けられた細孔あるいはキャピラリーの切開した細隙45より上方、即ち内方の第1のバッファ槽41に連結するキャピラリー内には必ずしもゲルが形成されていなくと

もよい。また、切断部を設ける場合には第1のバッファ槽41は外側の第2のバッファ槽42との間に一定の位置関係を保ち保持される必要がある。

【0030】特に図示しないが、この実施例のものを図3に示した実施例のような平板型ゲルを用いた装置にも適用できることは容易に理解されよう。なお、以上の第1～第4の実施例では分離部にゲルを持つ場合について述べたが、ゲルなどの担体を持たない場合にも本発明は適用できる。

10 【0031】

【発明の効果】本発明によれば、広い試料注入ウェルに注入した試料を電気泳動により、狭い領域に濃縮して保持した後に、電気泳動分離するので作製した試料の大部分を有効に分析に使用でき、濃度の低い試料でも感度良く分離、検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明による第1の実施例の概念図。

【図2】本発明による第2の実施例の断面図。

【図3】本発明による平板ゲルを用いた第3の実施例の断面による見取図。

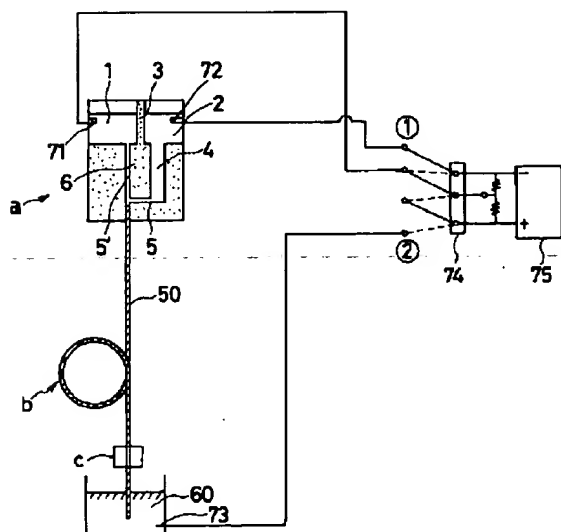
【図4】本発明による第4の実施例の断面図。

【図5】従来のキャピラリー電気泳動装置の概念図。

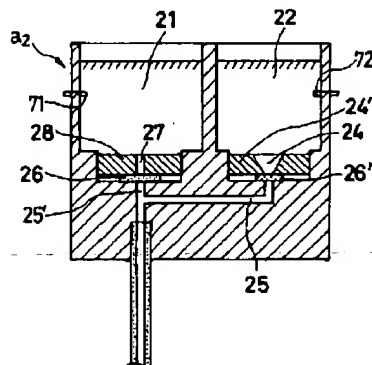
【符号の説明】

1…第1バッファ槽、2…第2バッファ槽、60…第3のバッファ槽、4…試料注入ウェル、5…細管、5'…細管領域（試料保持部領域）、6…第1の分子ふるい膜、26'…第2の分子ふるい膜、71、72、73…泳動電極、74…泳動電源切換スイッチ、75…泳動電源、a…試料注入部、b…泳動分離部、c…検出部

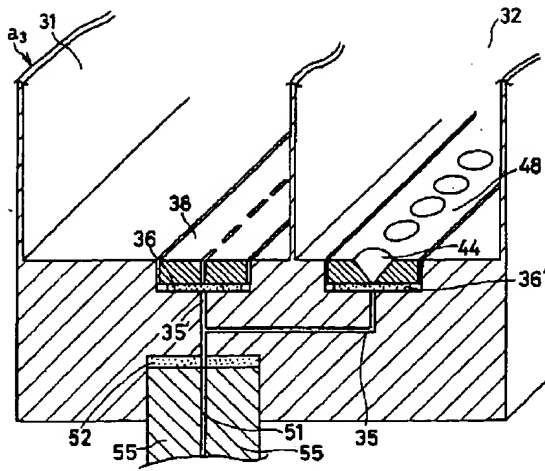
【図1】



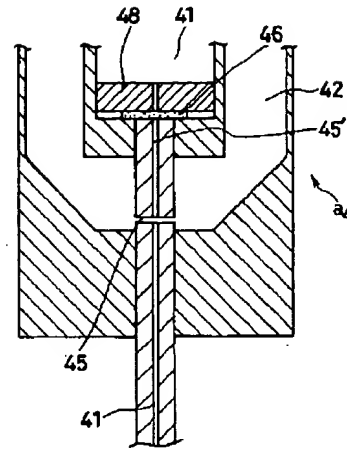
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

